



IFW

## IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of: Takeshita et. al.	
	Art Unit: 1651
Application No.: 10/791,853	Examiner: [to be assigned]
Filing Date: March 4, 2004	Atty. Docket: US-163
Title: METHOD FOR PRODUCING ALCOHOL BY USING MICROORGANISM	

## CLAIM FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. § 119 IN UTILITY APPLICATION

Commissioner of Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450


Sir:

Priority under 35 U.S.C. § 119 is hereby claimed to the following priority document(s), filed in a foreign country within one (1) year prior to the filing of the above-referenced United States utility patent application:

Country	Priority Document Appl. No.	Filing Date
Japan	No. 2001-270903	September 6, 2001

A certified copy of the listed priority document and a translation of the front page is submitted herewith. Prompt acknowledgment of this claim and submission is respectfully requested.

Respectfully submitted,

  
Shelly Guest Cermak  
Reg. No. 39,571

Date: March 30, 2005  
PTO Customer Number: **000038108**  
Ajinomoto Corporate Services LLC.  
1120 Connecticut Avenue, Ste. 1010  
Washington, D.C. 20036  
202.457.0284  
202.457.0107 (fax)

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日      2 0 0 1 年   9 月   6 日  
Date of Application:

出 願 番 号      特 願 2 0 0 1 - 2 7 0 9 0 3  
Application Number:

[ST. 10/C]      [ J P 2 0 0 1 - 2 7 0 9 0 3 ]

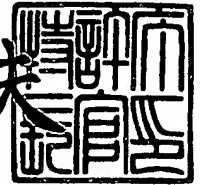
願      人      味の素株式会社  
Applicant(s):

CERTIFIED COPY OF  
PRIORITY DOCUMENT

2 0 0 4 年   2 月 1 8 日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出 証 番 号    出 証 特 2 0 0 4 - 3 0 1 0 3 2 1

【書類名】 特許願

【整理番号】 P-8907

【提出日】 平成13年 9月 6日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C07C 27/12

【発明の名称】 微生物を用いたアルコールの製造法

【請求項の数】 9

【発明者】

    【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社発酵  
技術研究所内

    【氏名】 竹下 亮

【発明者】

    【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社発酵  
技術研究所内

    【氏名】 安枝 寿

【発明者】

    【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社発酵  
技術研究所内

    【氏名】 郡司 義哉

【特許出願人】

    【識別番号】 000000066

    【氏名又は名称】 味の素株式会社

【代理人】

    【識別番号】 100089244

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 遠山 勉

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100090516

【弁理士】

【氏名又は名称】 松倉 秀実

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100100549

【弁理士】

【氏名又は名称】 川口 嘉之

【連絡先】 0 3 - 3 6 6 9 - 6 5 7 1

## 【手数料の表示】

【予納台帳番号】 012092

【納付金額】 21,000円

## 【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 微生物を用いたアルコールの製造法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 本来アルカン及びその酸化によって生成するアルコールを資化しない微生物であって、メタンオキシゲナーゼをコードする DNA で形質転換されたことによってアルカンをアルコールに変換する能力を獲得した微生物の形質転換体を培養し、得られた培養物又はこの培養物より分離した菌体もしくはその菌体の処理物をアルカンと共存させ、アルコールを生成させる、アルコールの製造方法。

【請求項 2】 前記メタンオキシゲナーゼが可溶型メタンオキシゲナーゼである請求項 1 記載のアルコールの製造法。

【請求項 3】 前記メタンオキシゲナーゼが、メタンヒドロキシラーゼ、B コンポーネント、及びリダクターゼからなる請求項 2 記載のアルコールの製造法。

【請求項 4】 前記メタンオキシゲナーゼをコードする DNA が、メチロコッカス・カプスラタスの可溶型メタンオキシゲナーゼ遺伝子である請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載のアルコールの製造法。

【請求項 5】 前記微生物が、エシェリヒア属細菌、コリネ型細菌又はバチルス属細菌である請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載のアルコールの製造法。

【請求項 6】 前記微生物が、エシェリヒア属細菌である請求項 5 記載のアルコールの製造法。

【請求項 7】 前記培養を、20 ～ 30℃で行う請求項 6 記載のアルコールの製造法。

【請求項 8】 前記アルカンが炭素数 1 ～ 8 のアルカンであり、アルコールが各々のアルカンの酸化によって生成するアルコールである請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載のアルコールの製造法。

【請求項 9】 前記アルカンがメタンであり、アルコールがメタノールである請求項 8 記載のアルコールの製造法。

【発明の詳細な説明】

## 【 0 0 0 1 】

## 【発明の属する技術分野】

本発明は、微生物を用いたメタノール等のアルコールの製造法に関し、詳しくは、アルカンを微生物を用いた生化学的な酸化により、極めて緩和な条件下でアルコールに変換する方法に関するものである。

## 【 0 0 0 2 】

## 【従来の技術】

現在のメタノールの製造工程は、原料のメタンを一酸化炭素と水素の混合ガスに改質する「合成ガス製造工程」と、その合成ガスを触媒の存在下で反応させてメタノールに転換する「メタノール合成工程」からなる。この合成ガス製造工程は850～880℃、メタノール合成工程は50～100気圧という高温高压下で行われており、より緩和な条件下でのメタノール合成法が研究されている。近年、比較的熱安定性の高い金属錯体系触媒を用い、メタンからメタノールを高収率で合成する方法が報告されているが (Science Vol.280, 24 April (1998) 560-563)、この方法においても100℃以上の温度を必要としている。

## 【 0 0 0 3 】

一方、メタン資化性菌が有するメタンモノオキシゲナーゼ酵素 (以下、「MMO」と略記する) を用いると、常温・常圧でメタンからメタノールを直接合成できる。MMOは、可溶型と膜結合型が存在することが知られており、可溶型MMO酵素は、ヒドロキシラーゼ、Bコンポーネント、リダクターゼ (Cコンポーネント) の3つのコンポーネントから形成される複合体蛋白である。この内、酸化反応はヒドロキシラーゼにより行われており、リダクターゼの代わりに化学的にヒドロキシラーゼを還元すれば、単独で酸化反応を触媒出来ることが報告されている。(J. Biol. Chem., 264(17)10023-10033, 1989) なお、ヒドロキシラーゼはAコンポーネントとも呼ばれ、これは更に3種類の蛋白質サブユニット  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  から構成される。

## 【 0 0 0 4 】

米国特許第5, 190, 870号には、メタン資化性菌から精製したヒドロキシラーゼを利用したアルカノールの酵素学的製造方法が示されているが、このヒドロキシ

ラーゼの精製方法は複雑であり、単離後の活性低下が大きく不安定である。また、米国特許第5,192,672号には、ヒドロキシラーゼの精製後の活性を安定化させる方法が示されているが、精製方法が煩雑であるという根本的な問題を解決できていない。

#### 【0005】

一方、メタン資化性菌の菌体そのものを利用して、微生物学的にメタノールを得る方法も知られている。しかし、MMOを保持する菌体はメタノールデヒドロゲナーゼ等を同時に保持しており、メタンの酸化により生ずるメタノールは、直ちに酸化され、ホルムアルデヒドに変化し、菌体内で代謝されてしまうという問題点がある。特開平3-43090号公報には、シクロプロパンによりメタノールデヒドロゲナーゼを選択的に阻害する方法が開示されているが、MMOを保持する菌体の懸濁液の空気相をシクロプロパンに置換し、更にその後、ヘリウムによりシクロプロパンを除去したりと大変煩雑であり、またシクロプロパンによるメタノール脱水素酵素の失活が十分にできない可能性もあるという問題が残されている。

#### 【0006】

Journal of General Microbiology (1992), 138, 1301-1307には、メチロコッカス・カプスラタス バス (Methylococcus capsulatus (Bath)) 由来の可溶型MMOのBコンポーネントとリダクターゼをエシェリヒア・コリ (Escherichia coli) 中で発現させ、それらを天然のヒドロキシラーゼと混合することによって、MMO活性の発現に成功したことが示されている。また、Arch Microbiol (1999) 171:364-370には、膜結合型MMOのみを有するメタン資化性菌に可溶型MMOの遺伝子を導入して、MMO活性発現に成功したことが報告されている。しかし、MMOの全コンポーネントを、メタンやメタノールを資化しない微生物中で活性発現させた例は無く、この複雑な酵素複合体を異種生物で発現させることが期待されていた。

#### 【0007】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、可溶型MMO（以下、「sMMO」ともいう）の全コンポーネントを、メタン及びメタノールを資化しない微生物中で発現させ、活性のあるsMMOを産生させること、及び、同微生物を用いてアルカンからアルコールを製造する方法を提

供することを課題とする。

#### 【0008】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者は、そもそもメタノールデヒドロゲナーゼ等のメタノールを酸化する酵素を持たない微生物、即ち、メタンやメタノールを資化しない微生物に可溶型MMOをコードする遺伝子クラスターを導入し、これを活性ある形で発現する微生物を構築し、同微生物を用いてメタンからメタノールを生成させる方法を考えた。しかし、sMMOは5つのサブユニットからなる複合体蛋白であり、活性型のsMMOを、特に異種の微生物内で活性ある形で発現させることは容易ではない。そこで、可溶型MMO発現プラスミドに用いるプラスミドやプロモーターの種類、また培養条件を鋭意検討した結果、異種の菌体内で活性を保持した状態でsMMOを発現させることに成功した。さらに、得られた微生物を用いて、メタンからメタノールを生成させることに成功し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は以下のとおりである。

#### 【0009】

(1) 本来アルカン及びその酸化によって生成するアルコールを資化しない微生物であって、メタンオキシゲナーゼをコードするDNAで形質転換されたことによってアルカンをアルコールに変換する能力を獲得した微生物の形質転換体を培養し、得られた培養物又はこの培養物より分離した菌体もしくはその菌体の処理物をアルカンと共存させ、アルコールを生成させる、アルコールの製造方法。

(2) 前記メタンオキシゲナーゼが可溶型メタンオキシゲナーゼである(1)のアルコールの製造法。

(3) 前記メタンオキシゲナーゼが、メタンヒドロキシラーゼ、Bコンポーネント、及びリダクターゼからなる(2)のアルコールの製造法。

(4) 前記メタンオキシゲナーゼをコードするDNAが、メチロコッカス・カプスラタスの可溶型メタンオキシゲナーゼ遺伝子である(1)～(3)のいずれかに記載のアルコールの製造法。

(5) 前記微生物が、エシェリヒア属細菌、コリネ型細菌又はバチルス属細菌である(1)～(4)のいずれかに記載のアルコールの製造法。



- (6) 前記微生物が、エシェリヒア属細菌である(5)のアルコールの製造法。
- (7) 前記培養を、20～30℃で行う(6)のアルコールの製造法。
- (8) 前記アルカンが炭素数1～8のアルカンであり、アルコールが各々のアルカンの酸化によって生成するアルコールである(1)～(7)のいずれかのアルコールの製造法。
- (9) 前記アルカンがメタンであり、アルコールがメタノールである(8)のアルコールの製造法。

#### 【0010】

##### 【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明に用いる微生物は、本来アルカン及びその酸化によって生成するアルコールを資化しない微生物であるが、sMMOをコードするDNAで形質転換されたことによってアルカンをアルコールに変換する能力を獲得した微生物である。尚、本発明に用いる微生物が前記アルコールを資化しないことは、アルカンをアルコールに変換することについては本質的ではないが、生成したアルコールを蓄積するためには、アルコールを資化しないことが好ましい。

#### 【0011】

本来アルカン及びその酸化によって生成するアルコールを資化しない微生物としては、sMMOをコードするDNAの導入によって、アルカンをアルコールに変換する能力を獲得し得るものであれば特に制限されないが、具体的には、エシェリヒア・コリ等のエシェリヒア属細菌、ブレヴィバクテリウム・ラクトファーメンタム（コリネバクテリウム・グルタミカム）等のコリネ型細菌、及びバチルス・ズブチリス等のバチルス属細菌等が挙げられる。

#### 【0012】

本発明に用いるメタンオキシゲナーゼをコードするDNAは、好ましくは可溶型MMO (sMMO) をコードするDNAである。sMMOは、Aコンポーネント（メタンヒドロキシラーゼ）、Bコンポーネント、及びCコンポーネント（リダクターゼ）の各コンポーネントからなる。また、Aコンポーネントは、 $\alpha$ 、 $\beta$ 及び $\gamma$ の各サブユニットからなる。これらのコンポーネントは、それぞれ独立して、微生物

に導入されてもよいが、全コンポーネントをコードするDNAを含む単一のベクターによって導入されることが好ましい。以下、このようなsMMOの全コンポーネントをコードする遺伝子クラスターは、便宜上sMMO遺伝子と呼ばれる。

#### 【 0 0 1 3 】

sMMO遺伝子は、メタン資化性菌、例えばメチロコッカス・カプスラタス バス NCIMB11132株の染色体DNAから得られる。この株は、例えばNCIMB (The National Collections of Industrial, Food and Marine Bacteria Ltd., 23 St. Machar Drive, Aberdeen AB2 1RY, Scotland, UK) より入手できる。

#### 【 0 0 1 4 】

以下に、メタン資化性菌として、メチロコッカス・カプスラタスからsMMO遺伝子を含む断片を調製する方法の一例を述べるが、他のメタン資化性菌からも、同様にして取得することができる。

#### 【 0 0 1 5 】

まず、メチロコッカス・カプスラタスを培養するために用いる培地としては該細菌が十分に増殖しうるものであればよいが、好適な培地としてホイッテンベリ一等の培地 (J. Gen. Microbiol., 61, 205-208, 1970) がある。培地を入れた培養容器の空間にはメタンと酸素含有ガス (空気など) との混合ガスにて置換し、該ガスと接触している培地にメチロコッカス・カプスラタスを接種する。メチロコッカス・カプスラタスは好気性細菌であり、その培養は20~50℃にて好気的条件下に回分培養もしくは連続培養を行えばよい。

#### 【 0 0 1 6 】

sMMO遺伝子を含むDNA断片は、同遺伝子の公知の塩基配列 (GenBank accession M90050 M32314 M58498 M58499, Stainthorpe, A.C., et al., Gene, 91 (1), 27-34, 1990) に基づいて作製したオリゴヌクレオチドをプライマーに用い、メチロコッカス・カプスラタスの染色体DNAを鋳型とするPCR法 (ポリメラーゼチェインリアクション) により、sMMO遺伝子の一部を含むDNA断片を取得し、同DNA断片をプローブとして、以下に述べる方法でメチロコッカス・カプスラタス株染色体由来のDNAライブラリーからハイブリダイゼーション法により、分離取得することができる。

**【0017】**

メチロコッカス・カプスラタスNCIMB11132株の培養液から染色体DNAは、それ自体既知の通常用いられる方法（例えば、[Biochem. Biophys. Acta., 72, 619(1963)]）等で抽出することができる。

**【0018】**

DNAライブラリーは、染色体DNAを適当な制限酵素、例えばBamHIを用いて分解し、得られる様々な大きさのDNA断片をプラスミドベクター、例えばpUC18（宝酒造製）に連結し、連結反応液を用いて適当な宿主、例えばエシェリヒア・コリJM109を形質転換することにより、調製することができる。

**【0019】**

ハイブリダイゼーションによりsMMO遺伝子を含むDNA断片を持つクローンを選択するためのプローブは、sMMO遺伝子の公知の塩基配列から適宜設定した塩基配列、例えば配列番号1及び2に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとし、メチロコッカス・カプスラタスの染色体DNAを鋳型とするPCRによって、得ることができる。

**【0020】**

上記のようにして得られるプローブを用いて、メチロコッカス・カプスラタスNCIMB11132株の染色体DNAライブラリーについて、コロニーハイブリダイゼーションを行う。ハイブリダイゼーションによりプローブであるsMMO遺伝子部分DNA断片とハイブリダイズするクローンからプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを適当な制限酵素により切断し、挿入断片を得ることにより、sMMO遺伝子又はその一部を含むDNA断片を取得することができる。

**【0021】**

上記のようにして得られたクローン断片が、sMMO遺伝子の一部を含む場合は、残りの領域は、PCR法、ハイブリダイゼーション法等によって、取得することができる。例えば、クローン化断片がsMMO遺伝子の5'側を欠いている場合には、クローン化断片の上流は、5'-RACE法によって取得することができる。また、配列番号3及び配列番号4に示すオリゴヌクレオチドをプライマーとし、NCIMB11132株の染色体DNAを鋳型とするPCRによっても、sMMO遺伝子の上流側を取得するこ

とができる。得られたDNA断片を、先に得られたsMMO遺伝子断片と連結することによって、sMMO遺伝子全長を取得することができる。

#### 【0022】

sMMO遺伝子を宿主微生物に導入するのに使用されるベクターとしては、宿主微生物において複製可能なものであればよく、具体的には、エシェリヒア属細菌用のベクターとしては、pUC19、pUC18、pBR322、pHSG299、pHSG298、pHSG399、pHSG398、RSF1010、pMW119、pMW118、pMW219、pMW218等のプラスミドベクターが挙げられる。また、コリネ型細菌用のベクターとしては、pAM330（特開昭58-67699号公報参照）、pHM1519（特開昭58-77895号公報参照）、pAJ655、pAJ611、pAJ1844（以上、特開昭58-192900号公報参照）、pCG1（特開昭57-134500号公報参照）、pCG2（特開昭58-35197号公報参照）、pCG4、pCG11（以上、特開昭57-183799号公報参照）、pHK4（特開平5-7491号公報参照）等が挙げられる。また、バチルス属細菌用のベクターとしては、pUB110、pHY300PLK、pHV1248、pE194、pC194、pBC16、pSA0501、pSA2100、pAM77、pT181、pBD6、pBD8及びpBD64、pHV14等が挙げられる。

#### 【0023】

sMMO遺伝子のプロモーターは、導入する微生物に応じて、適当なプロモーターに置換してもよい。そのようなプロモーターとしては、lacプロモーター、trpプロモーター、trcプロモーター、tacプロモーター、ラムダファージのP<sub>R</sub>プロモーター、P<sub>L</sub>プロモーター、tetプロモーター、amyEプロモーター等が挙げられる。ベクターとして、プロモーターを含む発現ベクターを用いると、sMMO遺伝子と、ベクター及びプロモーターとの連結を一度に行うことができる。このようなベクターとしては、tacプロモーターを含むpKK233-3（ファルマシア社製）等が挙げられる。

#### 【0024】

上記のようにしてsMMO遺伝子が組み込まれたベクターを目的の微生物に導入するための形質転換法としては、例えば、エシェリヒア コリ K-12について報告されているような、受容菌細胞を塩化カルシウムで処理してDNAの透過性を増す方法（Mandel, M. and Higa, A., J. Mol., Biol., 53, 159 (1970)）や、バチルス

ズブチリスについて報告されているような、増殖段階の細胞からコンピテントセルを調製してDNAを導入する方法（Duncan, C.H., Wilson, G.A. and Young, F.E., Gene, 1, 153(1977)）を用いることができる。あるいは、バチルス ズブチリス、放線菌類および酵母について知られているような、DNA受容菌の細胞を、組換えDNAを容易に取り込むプロトプラストまたはスフェロプラストの状態にして組換えDNAをDNA受容菌に導入する方法（Chang, S. and Choen, S.N., Molec. Gen., Genet., 168, 111(1979); Bibb, M.J., Ward, J.M. and Hopwood, O.A., Nature, 274, 398(1978); Hinnen, A., Hicks, J.B. and Fink, G.R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929(1978)）も応用できる。これらの方法は、宿主として用いる細胞に応じて適宜選択すればよい。さらには、電気パルス法（杉本ら, 特開平2-207791号公報）によっても、組換えDNAをブレヴィバクテリウム属またはコリネバクテリウム属細菌に属する受容菌へ導入できる（OP199）。

#### 【0025】

ゲノムDNAライブラリーの作製、ハイブリダイゼーション、PCR、プラスミドDNAの調製、DNAの切断及び連結、形質転換等の方法は、Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1, 21(1989)に記載されている。

#### 【0026】

上記のようにして得られたsMMO遺伝子を含む発現ベクターpRSsMMOTBで形質転換されたE. coli JM109株は、AJ13852と命名され、平成13年8月2日に、独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（〒305-5466 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6）に、受託番号FERM P-18446として寄託されている。

#### 【0027】

上記のようにしてsMMO遺伝子を含むDNAで形質転換されたことによってアルカンをアルコールに変換する能力を獲得した微生物の形質転換体を培養し、得られた培養物又はこの培養物より分離した菌体もしくはその菌体の処理物をアルカンと共存させ、アルコールを生成させることにより、アルコールを製造することができる。

## 【0028】

sMMO遺伝子を導入された微生物の培養に使用する培地は、用いる微生物に応じて適宜選択することができる。一例を示すと、炭素源、窒素源、無機イオン及び必要に応じその他の有機成分を含有する通常の培地である。

## 【0029】

炭素源としては、グルコース、ラクトース、ガラクトース、フラクトースもしくはでんぶんの加水分解物などの糖類、グリセロールもしくはソルビトールなどのアルコール類、またはフマル酸、クエン酸もしくはコハク酸等の有機酸類を用いることができる。

## 【0030】

窒素源としては、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウムもしくはリン酸アンモニウム等の無機アンモニウム塩、大豆加水分解物などの有機窒素、アンモニアガス、またはアンモニア水等を用いることができる。

## 【0031】

有機微量栄養源としては、ビタミンB<sub>1</sub>などの要求物質または酵母エキスを適量含有させることが望ましい。これらの他に、必要に応じて、リン酸カリウム、硫酸マグネシウム、鉄イオン、マンガンイオン等が少量添加される。

## 【0032】

培養は、好氣的条件下で16～72時間実施するのがよく、培養温度は25℃～45℃に、培養中pHは5～8に制御する。尚、pH調整には無機あるいは有機の酸性あるいはアルカリ性物質、更にアンモニアガス等を使用することができる。

## 【0033】

尚、宿主微生物としてエシェリヒア・コリ等のエシェリヒア属細菌を用いる場合は、sMMOを構成する各サブユニットを可溶性ペプチドとして産生させるために、20～30℃で培養を行うことが好ましい。

## 【0034】

アルカンをアルコールに変換するための触媒として用いるのは、菌体又は菌体を含む培養物の他、菌体の処理物であってもよい。菌体の処理物としては、アセ

トン処理または凍結乾燥等した菌体、該菌体または生菌体より調製した無細胞抽出物、該無細胞抽出液から分画した膜画分等の分画物等、又はこれらの菌体、無細胞抽出物もしくは分画物を固定化した固定化物であってもよい。これらの菌体又は菌体処理物をアルカンに接触反応させることにより、反応液中にアルコールを生成させることができる。用いる微生物は、一種でもよく、任意の二種以上の混合物として用いてもよい。また、微生物の生育を妨げないアルカンであれば、微生物の培養に用いる培地にアルカンを含有させることによって、微生物の培養とアルコールの製造を同時に行うこともできる。その場合、アルカンは、培地に接する気相に含ませるか、培地に吹き込むことによって、培地中に含有させることができる。また、本発明に用いる微生物としてエシェリヒア属細菌等の還元力の強い微生物を用いるか、反応液中にNADHを添加することによって、sMMOにより触媒する反応を効率よく進行させることができる。

#### 【0035】

本発明を適用するアルカンとしては、好ましくは炭素数1～8、より好ましくは1～6、特に好ましくは炭素数1～5のアルカンである。なかでも、メタンが最も好適である。また、sMMOによってアルカンが酸化される位置は特に制限されず、末端の炭素に結合している水素でもよく、複数の炭素が結合している炭素に結合している水素でもよい。また、アルカンは直鎖状でもよく、分岐鎖状でもよく、また、環状であってもよい。また、アルカンは、ハロゲン等の置換基を有していてもよい。

メチロコッカス・カプスラタス バス株のsMMOの基質特異性については研究が行われており (Colby, J. et al., Biochem. J. (1977) 165, 395-402)、少なくともメタンからオクタンまでのアルカンを酸化し、アルコールを生成する能力を有していることが示されている。

#### 【0036】

##### 【実施例】

本発明を、実施例によりさらに具体的に説明する。

<1>メタン資化性細菌メチロコッカス・カプスラタスの染色体DNAライブラリーの作製

ホイッテンベリー等の培地 [J. Gen. Microbiol., 61, 205-208, 1970] を入れた培養容器の空間を、メタンと空気との混合ガスにて置換した。該ガスと接触している培地にメタン資化性細菌メチロコッカス・カプスラタス NCIMB11132株を接種し、ガス置換を行いながら好氣的条件で回分培養した。

#### 【0037】

上記のようにして培養したメチロコッカス・カプスラタス NCIMB11132の菌体から、Biochem. Biophys. Acta., 72, 619 (1963)に記載の方法で、染色体DNAを抽出した。この染色体DNAを制限酵素BamHIを用いて完全分解した。得られた様々な大きさのDNA断片を、プラスミドベクターpUC18 (宝酒造(株)製)のBamHI部位に挿入した。得られた組換えプラスミドでエシェリヒア・コリJM109を形質転換し、染色体DNAライブラリーを作製した。

#### 【0038】

<2>コロニーハイブリダイゼーションによるsMMO遺伝子のクローニング

上記染色体DNAライブラリーからsMMO遺伝子断片を含むクローンを、コロニーハイブリダイゼーションにより選択した。ハイブリダイゼーション用のプローブは、PCR法によりsMMO遺伝子断片を増幅することによって調製した。メチロコッカス・カプスラタスのsMMO遺伝子は、その塩基配列が既に報告されており [Gene, 91, 27-34 (1990)]、その配列に基づいて配列番号1及び配列番号2に示すオリゴヌクレオチドを合成した。

#### 【0039】

前記と同様にして調製したメチロコッカス・カプスラタスの染色体DNAを鋳型とし、上記オリゴヌクレオチドをプライマーとしてPCR反応を行った。PCR反応は、デナチュレーション工程 (94℃、10秒)、アニーリング工程 (55℃、30秒)、及びエクステンション工程 (72℃、1分30秒) からなるサイクルを30サイクル行った。

#### 【0040】

上記のようにして増幅されたsMMO遺伝子の部分断片をプローブとして、前記染色体DNAライブラリーについてコロニーハイブリダイゼーションを行った。プローブの標識及びハイブリダイゼーション反応は、DIG-ハイプライム DNAラベリ



ング&デテクション スターターキット I (ベーリンガー・マンハイム社より購入) を用い、添付のプロトコールに従って行った。

#### 【 0 0 4 1 】

ハイブリダイゼーションの陽性クローンから組換えプラスミド DNA を抽出し、該プラスミド DNA を制限酵素 BamHI により切断し、挿入断片を確認した。その結果、プラスミド pUC18 の長さ約 2.3kb の DNA 断片に加え、大きさが約 6kbp の挿入 DNA 断片が認められた。

#### 【 0 0 4 2 】

この挿入 DNA を種々の制限酵素により切断し、目的の sMMO 遺伝子の大部分を含む断片であることを確認した。その結果、前記断片は、sMMO を構成する  $\alpha$  サブユニットをコードする遺伝子の一部を欠落していることが判明した。この約 6kbp の挿入 DNA 断片を含む組換えプラスミドを、pUC6K と命名した。

#### 【 0 0 4 3 】

##### < 3 > sMMO 遺伝子全長を含むプラスミドの構築

次に、欠落を含む sMMO 遺伝子上流領域を、以下に示すように、PCR 法により取得した。合成したプライマーの塩基配列を、配列表の配列番号 3 及び配列番号 4 に示す。NCIMB11132 株の染色体 DNA を鋳型とし、上記オリゴヌクレオチドをプライマーとして用いて、PCR 反応を行った。PCR 反応は、デナチュレーション工程 (98℃、10 秒)、アニーリング工程 (60℃、30 秒)、及びエクステンション工程 (72℃、180 秒) からなるサイクルを 30 サイクル行った。得られた約 1.5kbp の増幅 DNA 断片を、制限酵素 EcoRI と BamHI で消化し、pUC118 のマルチクローニングサイトにライゲーションした。このプラスミドの BamHI 部位に、pUC6K から BamHI で切り出される約 6kbp の断片を組み込み、sMMO 遺伝子の全長を含むプラスミド pUCsMMO を得た。

#### 【 0 0 4 4 】

##### < 4 > sMMO 遺伝子発現プラスミドの構築

次に、上記のプラスミド pUCsMMO から、制限酵素 EcoRI と HindIII を用い、sMMO 遺伝子領域を切り出し、発現ベクター pKK233-3 (ファルマシア社製) の tac プロモーターの下流に組み込み、tac プロモーターからの転写が sMMO 遺伝子に流れ込

むように構築した発現プラスミドpKKsMMOを得た。

#### 【 0 0 4 5 】

pKKsMMOを制限酵素NdeIとDraIにより消化し、pKK233-3由来のtacプロモーター領域を含むsmmo遺伝子を切り出して末端を平滑化し、制限酵素PstIで消化した後、末端を平滑化した広宿主域ベクターpRS(特表平3-501682に記載)にライゲーションして、sMMO発現プラスミドpRSsMMOTBを取得した。

#### 【 0 0 4 6 】

##### < 4 > sMMO発現の確認

AJ13852株を、ストレプトマイシンを20 mg/ml含むLB液体培地に植菌し、25℃で一晩前培養したものを、同様に調製した液体培地に1%(v/v)植菌して、25℃で本培養した。本培養では、OD<sub>660</sub>が0.6に到達した時点でIPTG (イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド) を終濃度1mMになるように添加し、さらに2.5時間培養した。この培養条件で得られた菌体を超音波破碎した後、遠心分離を行い、可溶性画分と不溶性画分に分画した。各々の画分について、sMMOを構成する各成分ペプチドに対する抗体を用いて分析した。その結果、sMMOの $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ の全サブユニットと、B、Cの両コンポーネントが可溶性画分に存在することを確認した。

#### 【 0 0 4 7 】

上記の培養を全て37℃で行うと、 $\alpha$ サブユニットは完全に封入体を形成し、可溶性画分には存在しなかった。さらに、 $\beta$ 、 $\gamma$ 両サブユニットも大半が不溶性であった。また、培養を30℃で行うと、25℃の場合と比較して可溶性画分に存在する $\alpha$ サブユニットの量が少なかった。

#### 【 0 0 4 8 】

##### < 5 > メタンからのメタノールの製造

AJ13852株を上記と同様にして(温度は25℃)、100 mlの培地を用いて培養し、集菌後、50mM リン酸カリウム緩衝液(pH7.0)で菌体を洗浄した。その後、菌体を同緩衝液(pH7.0)に懸濁し、超音波破碎により無細胞抽出液を得た。無細胞抽出液の総蛋白濃度を、15 mg/mlに調整した。5 ml容量のアルミシールバイアルに上記無細胞抽出液を1 ml入れ、NADH (還元型ニコチンアミドアデニンジヌク

レオチド)を終濃度1 mMになるように添加し、密閉してからメタンガスを5 ml (1atm換算)封入し、反応を行った。反応は、37℃で振とうしながら60分間行った。また、AJ13852株、及びベクターpRSのみを導入したE. coli JM109/pRSを、メタンガスを封入しない以外は上記と同様にして培養した。

#### 【0049】

メタノール濃度の定量は、3段階の酵素反応を用いる定量系により行った。反応液組成を表1に示す。まず、上記メタノール生成反応後の反応液を600  $\mu$ l取り、50  $\mu$ lの5N 水酸化カリウムを添加し、よく攪拌してから5分間放置した。次に、5M 塩化ナトリウムを50  $\mu$ l添加し、さらに1M リン酸カリウム緩衝液でpH7.5に調整した。その後、遠心分離により変性蛋白を除いてから、以下の酵素反応に供した。

#### 【0050】

【表 1】

表 1

検量線	
MeOH (0~1000 mM)	20 $\mu$ l
酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (終濃度 1mM)	2 $\mu$ l
アルコールオキシダーゼ (1 mg/ml)	7 $\mu$ l
ホルムアルデヒド脱水素酵素 (1 mg/ml)	17 $\mu$ l
ジアホラーゼ (終濃度 2U/ml)	20 $\mu$ l
ヨードニトロ テトラゾリウム (終濃度 1mM)	20 $\mu$ l
サンプル (メタンガスなし)	20 $\mu$ l
25 mM 磷酸カリウム緩衝液	94 $\mu$ l
合計 200 $\mu$ l	
測定サンプル	
酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (終濃度 1mM)	2 $\mu$ l
アルコールオキシダーゼ (1 mg/ml)	7 $\mu$ l
ホルムアルデヒド脱水素酵素 (1 mg/ml)	17 $\mu$ l
ジアホラーゼ (終濃度 2U/ml)	20 $\mu$ l
ヨードニトロ テトラゾリウム (終濃度 1mM)	20 $\mu$ l
サンプル (メタンガス存在下)	20 $\mu$ l
25 mM 磷酸カリウム緩衝液	114 $\mu$ l
合計 200 $\mu$ l	

## 【0051】

酵素反応は、以下の手順で行った。アルコールオキシダーゼによりメタノールをホルムアルデヒドに変換し、ホルムアルデヒド脱水素酵素によりホルムアルデヒドからギ酸を生成させる。その際、生成するNADHをジアホラーゼの呈色反応により、550nmの吸光度として定量した。なお、アルコールオキシダーゼ、ホルムアルデヒド脱水素酵素はシグマ社より、ジアホラーゼは東洋紡社より、そしてヨードニトロ テトラゾリウムはナカライテスク社より、各々購入した。

## 【0052】

AJ13852株と、ベクターpRSのみを導入したE. coli JM109/pRSを用いて、メタンガスを封入しないで得た反応液に対し、上記3段階酵素反応を適用し、測定された吸光度を、それぞれメタノール濃度0Mとした。その値を基準にして、各種濃

度のメタノールを、前記定量系に添加して、吸光度に対するメタノール量をプロットして、検量線を作成した(図1)。その結果、この測定系では、メタノール濃度が200 $\mu$ Mから1000 $\mu$ Mの範囲において、メタノール濃度値と吸光度値が直線的に対応することがわかった。

#### 【0053】

上記検量線を用いて、各菌体によるメタノール生成量を定量した結果、E. coli JM109/pRSを用いた場合は、メタノールの生成が検出されなかったのに対して、AJ13852株を用いた場合は、メタノールの生成が確認され、その濃度は240 $\mu$ Mであった。この反応の比活性は、酵素液中の蛋白質1mg当たり、0.33nmol/分であった。

#### 【0054】

##### 【発明の効果】

本発明により、本来アルカン及びその酸化によって生成するアルコールを資化しない微生物に、アルカンをアルコールに変換する能力を付与することができ、得られた微生物を用いてアルカンからアルコールを製造することができる。

#### 【0055】

##### 【配列表】

##### SEQUENCE LISTING

<110> Ajinomoto Co., Inc.

<120> 微生物を用いたアルコールの製造法

<130> P-8907

<140>

<141> 2001-09-06

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.0

【 0 0 5 6 】

<210> 1

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 1

ggtaagttta tgcagcgagt tcacactatc acggcggg

38

【 0 0 5 7 】

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 2

tcgaagcttc cccggttcag gccgccccgg

30

【 0 0 5 8 】

<210> 3

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 3

cgtgaattcc cgtcggagca ttcggataac gtgctcatc

39

【 0 0 5 9 】

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 4

attaagctta agcgtgatag tcttcgagct tgcggtccag g

41

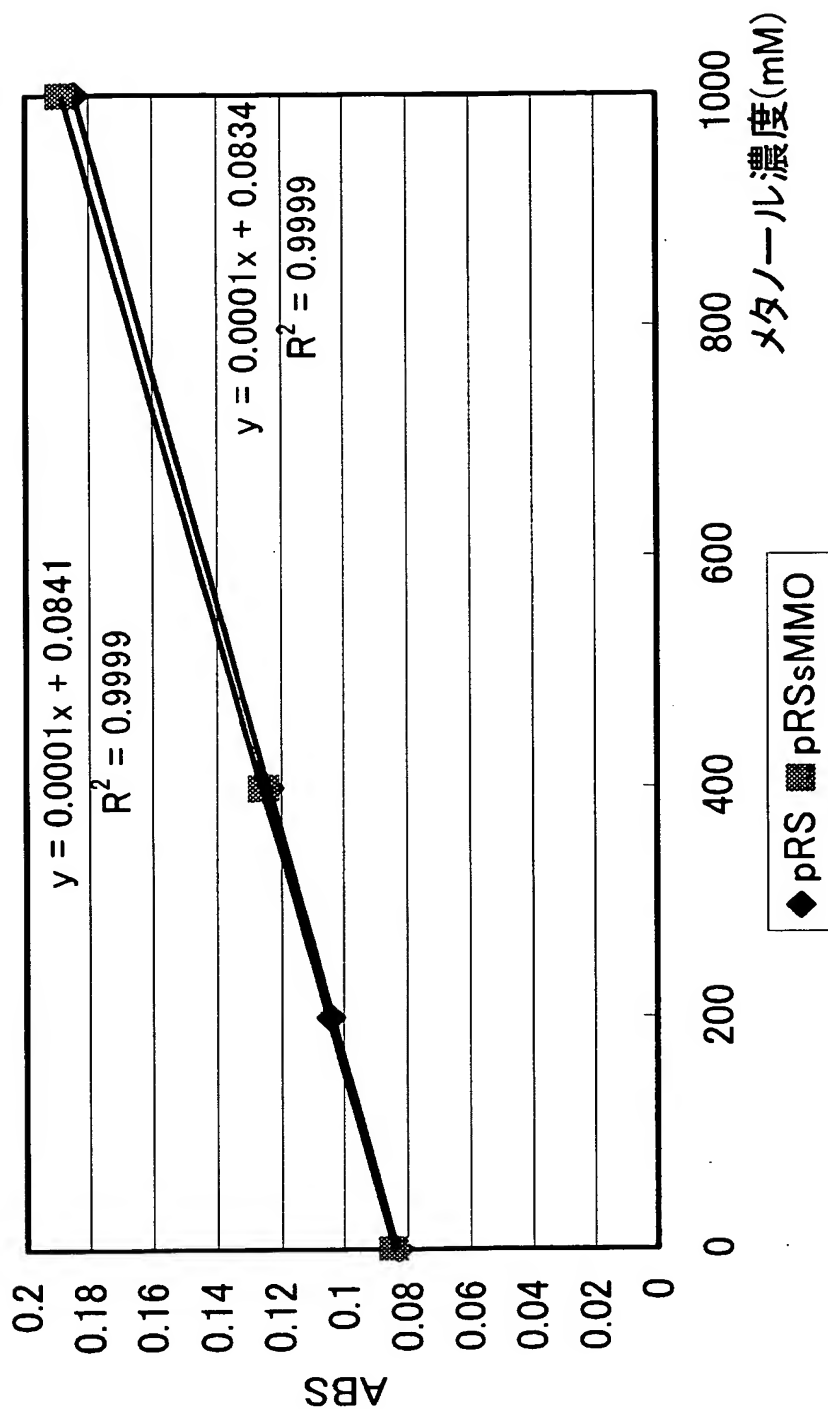
【図面の簡単な説明】

【図 1】 吸光度に対するメタノール量をプロットした検量線を示す図。横軸はメタノール濃度 (mM)、縦軸は吸光度である。◆はE. coli JM109/pRS、■はE. coli JM109/pRSsMMOTB (AJ13852) の結果を示す。

【書類名】

図面

【図 1】





【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 可溶型MMO（以下、「sMMO」ともいう）の全コンポーネントを、メタン及びメタノールを資化しない微生物中で発現させ、活性のあるsMMOを産生させ、同微生物を用いてアルカンからアルコールを製造する方法を提供する。

【解決手段】 本来アルカン及びアルコールを資化しない微生物であって、メタンオキシゲナーゼをコードするDNAで形質転換されたことによってアルカンをアルコールに変換する能力を獲得した微生物の形質転換体を培養し、得られた培養物又はこの培養物より分離した菌体もしくはその菌体の処理物をアルカンと共存させ、アルコールを生成させる。

【選択図】 図 1

特願 2 0 0 1 - 2 7 0 9 0 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 0 0 0 0 0 0 0 6 6 ]

1. 変更年月日 1 9 9 1 年 7 月 2 日

[変更理由] 住所変更

住 所 東京都中央区京橋 1 丁目 1 5 番 1 号

氏 名 味の素株式会社